

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-078779

(43)Date of publication of application : 27.03.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C07K 14/47  
C07K 16/18

(21)Application number : 11-263707

(71)Applicant : SUMITOMO ELECTRIC IND LTD

(22)Date of filing : 17.09.1999

(72)Inventor : SAKAGUCHI SHIGE0

## (54) CALPP PROTEIN, POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME AND ANTIBODY

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new CALPP protein which comprises a CALPP protein containing a specific amino acid sequence and permits the productive control of immunoglobulin as a signal molecule transmitting the antigen stimulation of the B cell and the stimulation of CD 40 or the control of autoimmune diseases.

**SOLUTION:** This CALPP protein is the new CALPP protein comprising the amino acid sequence represented by the formula, functions as the control molecule of calcium-binding protein dephosphoenzyme comprising a signal molecule transmitting the antigen stimulation of the B cell and the stimulation of CD 40 and is a functional molecule in the nucleus and cytoplasm of the B cell which transmits the stimulation of CD 40 to control the effective production of immunoglobulin, inhibits the multiplication of the abnormal antibody productive B cell and permits the control of autoimmune diseases. This CALPP protein is obtained by using a mouse DNA library as a template DNA, carrying out PCR using the partial sequence of CALPP gene as a primer, combining the resultant CALPP cDNA with a plasmid or the like to transduce into the host cell and cultivating the resultant transformant.

```

Met Asn Glu Lys Asp Val Leu Arg Arg Arg  10
      F              20
Asp Pro Lys Arg Lys Lys Ser Gln Gln Leu Lys Asp Gln Gln  30
      20      25      30
Asp Leu Thr Val Lys Val Ser Gln Trp Lys Gly Gly Arg Lys Asn  40
      35      40      45
:
:
:
Phe Phe Arg Asn Lys Gln Glu Leu Ser Lys Lys His Gly Gln Asp Arg  50
  370      375      380
His Leu Lys His Pro Lys Met Ser Arg Ser Lys Ser Lys Trp Ser  60
  385      390      395      400
Asu Glu Arg His Leu
      405

```

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-78779

(P2001-78779A)

(43) 公開日 平成13年 3 月27 日 (2001. 3. 27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
16/18		16/18	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平11-263707

(22) 出願日 平成11年 9 月17 日 (1999. 9. 17)

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目 5 番33号

(72) 発明者 阪口 薫雄

熊本県熊本市本荘二丁目 2 番 1 号 熊本大

学医学部免疫学講座内

(74) 代理人 100078813

弁理士 上代 哲司 (外 2 名)

Fターム (参考) 4B024 AA01 BA61 BA80 CA04 CA09

DA12 EA04 GA11 GA19 HA17

4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA75

EA22

(54) 【発明の名称】 CALPP蛋白質、これをコードするポリヌクレオチドおよび抗体

(57) 【要約】

【課題】 免疫グロブリンの有効な産生の制御および自己免疫疾患の制御を可能とするB細胞の核内および細胞質内での蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチドおよび該蛋白質を認識する抗体を提供すること。

【解決手段】 カルシウム結合蛋白質脱リン酸化酵素制御分子であり、CD40の刺激を伝達して免疫グロブリンの有効な産生の制御を担い、異常抗体産生B細胞の増殖を抑制するCALPP蛋白質およびCALPP変異体を提供する。また、CALPPまたはCALPP変異体をコードするポリヌクレオチドを提供する。さらに、CALPPまたはCALPP変異体を認識する抗体を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる CALPP 蛋白質。

【請求項 2】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列における一または複数のアミノ酸を欠失、他のアミノ酸と置換または他のアミノ酸を付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の 679 番目ないしから 1028 番目までのアミノ酸からなる蛋白質と結合する CALPP 蛋白質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチドまたは該アンチセンスポリヌクレオチドの誘導体。

【請求項 5】 連続する 12 以上の塩基からなる請求項 3 または 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】 化学修飾された請求項 3 ないし 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド

【請求項 7】 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質を認識する抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、B 細胞の抗原刺激と CD40 の刺激を伝達するシグナル分子であるカルシウム結合蛋白質脱リン酸化酵素制御分子およびそれをコードする遺伝子ならびに前記制御分子を認識する抗体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】B 細胞は免疫刺激を受けると末梢のリンパ組織で盛んに細胞分裂を行い、分化して最終的に抗体産生細胞になる。この過程では B 細胞において、免疫グロブリンの遺伝子の再構成や V 領域の体細胞突然変異が行われ、B 細胞は抗原に対する結合力がより強い有効な抗体を産生する細胞、すなわち活性化された B 細胞に成熟する。活性化された B 細胞はリンパ組織の二次リンパ濾胞で胚中心を形成する。胚中心において、活性化された B 細胞は、やはり抗原で活性化されたヘルパー T 細胞や樹状細胞の刺激を受ける。この過程で、結合力の弱い B 細胞クローンや自己の抗原に反応する B 細胞クローンは選択排除されると考えられている。この B 細胞の分化ステージが有効な抗体産生を生み出す最も重要なプロセスであり、この機構を人為的に制御することが、免疫反応を人為的に制御することと密接に関連している。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、免疫グロブリンの有効な産生の制御および自己免疫疾患の制御を可能とする B 細胞の核内および細胞質内の機能分子である CALPP 蛋白質を提供することを課題とする。また、本発明は、前記機能分子をコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。また、本発明は、前

記機能分子を認識する抗体を提供することを課題とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の CALPP 蛋白質（以下 CALPP と称する）のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列である。

【0005】また、本発明は、CALPP のアミノ酸配列における一または複数のアミノ酸を欠失、他のアミノ酸と置換または他のアミノ酸を付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ CALPP の機能が保存されている CALPP 変異体を提供する。

【0006】また、本発明は、前記 CALPP または CALPP 変異体をコードするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドの代表的なものは、DNA と RNA であり、本明細書では、ポリヌクレオチドという語を、天然に存在しない化学修飾を施したものを含む意味で使用する。天然に存在する CALPP をコードする cDNA（以降、CALPP cDNA という）は、配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列からなる。

【0007】遺伝暗号の縮重により、ポリヌクレオチドがコードする蛋白質のアミノ酸配列を変えないようにして、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができる。したがって、本発明の CALPP をコードするポリヌクレオチドとは、縮重の全てのパターンを含むものである。

【0008】さらに、本発明は、前記ポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドまたは該アンチセンスポリヌクレオチドの誘導体を提供する。アンチセンスポリヌクレオチドはポリヌクレオチドに含まれるものであるが、本明細書では、特に、アンチセンス鎖であるポリヌクレオチドということを確認する場合に、ポリヌクレオチドの下位概念として、アンチセンスポリヌクレオチドという語を用いる。

【0009】さらに、本発明は、前記ポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する 12 塩基以上からなるポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。

【0010】さらに、本発明は、前記ポリヌクレオチドを化学修飾したポリヌクレオチドを提供する。前記したように、本明細書では、単にポリヌクレオチドというだけで、化学修飾されたものを含むが、特に、化学修飾されたということを明確にする場合に、ポリヌクレオチドの下位概念として、化学修飾されたポリヌクレオチドという語を用いる。

【0011】また、本発明は、CALPP または CALPP 変異体を認識する抗体を提供する。

## 【0012】

【発明の実施の形態】配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列のオープンリーディングフレームの 5' 末端側、

3'末端側それぞれの連続するいくつかの塩基からなるDNAをプライマーとし、鋳型DNAにマウスcDNAライブラリーを使用してPCRを行うことにより、本発明のCALPPをコードするcDNAを作製することができる。プライマーに使用する塩基の数は、後述するように12以上が好ましく、16以上がより好ましい。

【0013】CALPP変異体をコードするポリヌクレオチドはCALPPをコードするポリヌクレオチドに人工的に変異を生ぜしめて得ることができる。具体的には、サイトディレクテッドミュータジェネシスやランダムミュータジェネシス等の方法により行うことができる。例えば、CALPPcDNAを制限酵素で切断し、一部の塩基を削除または付加して再度結合することができる。あるいは、PCRによりCALPPcDNAを増幅するときに条件を調節して、増幅産物であるcDNAにランダムに変異を導入することができる。

【0014】CALPPやCALPP変異体の作製は、それらをコードするcDNAを適当な宿主に導入して発現させることにより行える。プラスミドを大腸菌や動物細胞等の適当な宿主に導入して、形質転換体を得る。得られた形質転換体を培養して蛋白質の発現を行わせ、CALPPを作製することが可能である。形質転換体の培養については、各種の教科書がある。このとき、宿主としては、大腸菌等の細菌、酵母、動物細胞のいずれも使用可能であるが、特に動物細胞が好ましい。細胞に遺伝子を導入するには、リボソーム法、エレクトロポレーション法等を用いることができる。

【0015】形質転換体に作製させたCALPPまたはCALPP変異体を含む培養物を回収し、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明のCALPPまたはCALPP変異体を精製することが可能である。例えば、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法および逆相クロマトグラフィー法等があり、適宜選択して行えばよい。

【0016】また、製造段階において、製造するCALPPまたはCALPP変異体は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして形質転換体に生産させてもよい。この場合は、精製工程において、ブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して、CALPPまたはCALPP変異体を切り出す操作が必要になる。

【0017】本発明のCALPPのアミノ酸配列における一または複数のアミノ酸を置換、欠失または付加したアミノ酸配列からなる蛋白質のうちGANPと結合する性質が保存されている蛋白質をCALPP変異体とする。CALPP変異体とGANPとの結合は、後述する

実施例2に示す試験管内結合検定で確認することができる。

【0018】本発明のCALPP変異体のアミノ酸配列は、該変異体をコードするcDNAの塩基配列から決定することが可能である。例えば、市販のプログラム（例えば、GENETYX（商標）-MAC（ソフトウェア開発社製）を用いて可能である。

【0019】DNAのセンス鎖またはRNAについては、その塩基配列と相補的な塩基配列からなるアンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAがそれぞれ存在する。本明細書では、特に断りがない限り、DNA（cDNAを含む）はセンス鎖とアンチセンス鎖の二本鎖からなるものを指し、RNAは一本鎖からなるものを指し、アンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAは一本鎖からなるものを指す。本発明は、アンチセンスポリヌクレオチドの誘導体を全て含む。誘導体は、例えば、アンチセンスポリヌクレオチドの3'末端もしくは5'末端に他の物質が結合したものやアンチセンスポリヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において、置換や欠失や付加といった修飾が生じた物質、あるいは天然に存在しないような塩基、糖、リン酸を有するものや、糖-リン酸骨格以外の骨格を有するものである。

【0020】アンチセンスポリヌクレオチド誘導体は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞膜透過性または結合力の少なくとも一つが高められた誘導体であることが好ましい。当該誘導体が、フォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体であると特に好ましい。本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体についても、これらの機能または構造を有する誘導体が含まれる。

【0021】本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、CALPPをコードするポリヌクレオチドに標準的な条件でハイブリダイズすることが可能なものであり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、12以上の塩基からなることが好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるのは、あまりに長くても不適である。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、CALPPの生合成を阻害させる場合、12以上35以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは16以上30以下、より好ましくは18以上25以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

【0022】ハイブリダイズのし易さの点では、一般的には、RNAのループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチド

またはその誘導体を設計するとよいとされている。

【0023】また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアンチセンスポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体であって、CALPPをコードする遺伝子またはmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の相補的な配列を含むものは、高い発現抑制効果が期待される。

【0024】本発明のアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体の製造方法としては、例えば、天然型のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成したり、CALPP cDNAを鋳型としてPCR法を行うことが挙げられる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機（例えば、ABI社製394型）を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されている説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体を得ることができる。

【0025】本発明のポリヌクレオチドまたはアンチセンスポリヌクレオチドの全長またはその一部はCALPP遺伝子やCALPP cDNAあるいはCALPP mRNAを検出するためのプローブまたはPCRのプライマーとして用いることができる。さて、ヒトの蛋白質の種類は $3 \times 10^9$ 個といわれている。16塩基のDNAは $4^{16}$ 種類存在するので、この長さのDNAがあればヒトの蛋白質を全て識別できる。すなわち、プローブまたはプライマーとして必要な長さは理論的には16塩基である。実用上もこの長さ以上であることが望ましいことは言うまでもないが、実用的には12以上の塩基からなるプローブが用いられることが多い。また、プローブまたはプライマーとして用いる箇所は、非コード領域、コード領域のいずれも使用可能である。GC含有率が30ないし70%であるものは、ポリヌクレオチドの立体構造の問題が生じにくくハイブリダイズし易いので、好ましい。

【0026】CALPP遺伝子を検出する方法としては具体的には、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法やRT-PCR法（『Current Protocols in Molecular Biology』（Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience）Chapter 15. 1. 1-15. 1. 9および同書15. 4. 1-15. 4. 6）またはインサイチュハイブリダイゼーション法（同書Chapter 14. 3. 1-14. 3. 14）もしくはインサイチュRNAハイブリダイゼーション法（Blood, 80, 2

044-2051, 1992）が挙げられる。インサイチュRNAハイブリダイゼーション法にはCALPPリボプローブが使用できる。CALPPリボプローブは、pBluescript等のプラスミドにCALPP cDNAを結合させ、T7ポリメラーゼを用いて試験管内転写を行うことによって作成することができる。

【0027】なお、ハイブリダイズの条件は、プローブの長さや使用するメンブランにより最適な条件が異なることがある。つまり、ハイブリダイズ条件は自ずから或る幅をもつものである。

【0028】DNAまたはRNAを化学合成するとき、標識すること、ビオチン化すること、側鎖をメチル化することまたはリン酸基部分のOをSに置換すること等の化学修飾することはよく知られている。例えば、配列表の配列番号2に記載のDNAを化学合成するとき、前記の化学修飾をして、配列表に示されたDNAそのものと異なるものを合成することが可能である。また、cDNAライブラリーから取得されたcDNAであっても放射性同位体で標識することが可能である。したがって、本発明のDNAおよびRNAは、上記の化学修飾されたDNA、RNAまたはアンチセンスポリヌクレオチドをその範囲に含むものである。本発明の化学修飾されたDNAまたはRNAは、蛋白質をコードする機能またはプローブもしくはプライマーとしての機能いずれも発揮可能なものであり、本発明の化学修飾されたアンチセンスポリヌクレオチドは、蛋白質の生合成を阻害する機能またはプローブもしくはプライマーとしての機能いずれも発揮可能なものである。

【0029】CALPPもしくはCALPP変異体またはそれらに特異的なアミノ酸配列からなるポリペプチドをヒト以外かつ該CALPPが由来する動物以外の動物に免疫することで該CALPPを認識する抗体（CALPP抗体）またはCALPP変異体を認識する抗体（CALPP変異体抗体）がそれぞれ得られる。このCALPP抗体またはCALPP変異体抗体がCALPPまたはCALPP変異体をそれぞれ認識することは、ウェスタンブロット法、ELISA法や免疫染色法（例えばFACSでの測定）等により確認できる。

【0030】また、免疫原として、蛋白質の一部であっても該蛋白質の一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものは、よく用いられる方法である。該蛋白質の一部は、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。なお、蛋白質の一部としては、8アミノ酸残基以上からなるものであることが好ましい。抗原性が明らかとなった物質については、免疫感作によってポリクローナル抗体が得られるならば、該免疫した動物のリンパ球を用いたハイブリドーマによりモノクローナル抗体が産生されることはよく知られている。したがって本発明の抗体はモノクローナル抗体もその範囲内に含むものである。

【0031】本発明においては、抗体は活性フラグメントをも包含するものである。活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味し、具体的には、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$ などを挙げることができる。例えば、本発明の抗体をペプシンで分解すると $F(ab')_2$ が得られ、パパインで分解すると $Fab$ が得られる。 $F(ab')_2$ を2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると $Fab'$ が得られる。 $Fv$ は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーで結合させた一価の抗体活性フラグメントである。これらの活性フラグメントを保持し、その他の部分を他の動物のフラグメントに置換することでキメラ抗体が得られる。

【0032】本発明の抗体は、CALPPの精製や検出のために使用でき、CALPPの発現等の機能の解明やB細胞の機能制御や自己免疫疾患の抑制の研究と、それらの知見に基づく疾患の治療または検査に利用可能である。

【0033】CALPPの検出については、抗体を用いる方法、酵素反応を利用する方法が挙げられる。抗体を用いる方法としては具体的には、①標識されたCALPP抗体を用いてCALPPを検出する方法、②CALPP抗体および該抗体の標識二次抗体を用いてCALPPを検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素(RI)、酵素、アビジン又はビオチン、もしくは蛍光物質(FITCやローダミン等)が利用される。

【0034】酵素反応を利用する方法としては、例えば、ELISA法、免疫凝集法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリーを用いた免疫反応分子の同定方法又はそれらに類似する方法が挙げられる。

#### 【0035】

【実施例】以下に実施例を示し、さらに詳細に本発明を説明する。

#### <実施例1> CALPP cDNAのクローニング

本発明者は、GANPと結合する新規な蛋白質の取得のため、酵母ツーハイブリッドスクリーニングシステム

(Yeast two hybrid screening)を用いた。この方法は、2つの遺伝子産物をそれぞれ転写因子のDNA接合部位と転写活性化部位に融合させ、両者の相互作用を転写活性を指標にして検出するものである。

【0036】酵母ツーハイブリッドスクリーニングは、クロンテック(Clontech)社のキットであるマツメイカーツーハイブリッドシステム2(MATCH MAKER(登録商標) Two-Hybrid System2)(カタログ番号K1604-1)を用いて、添付のマニュアルにしたがって行った。ベイト(結合性蛋白質を釣るための餌)には、PAS2-1-マウスGANPプラスミドをY190酵母細胞に遺伝子導入

したものを用いた。スクリーニングに用いたライブラリーはpGAD10-マウス新生仔cDNAライブラリー(胎生10日)(クロンテック社製)である。PAS2-1-マウスGANPプラスミドに導入されているGANP cDNAは、配列表の配列番号4の4236番目から5135番目の塩基からなる。

【0037】(1)前記cDNAライブラリー 5×10<sup>6</sup> クローンをマツメイカーツーハイブリッドシステム2(クロンテック社製)により、Leu欠乏、Trp欠乏およびHis欠乏培地で培養可能であることを指標として、前記システムに添付の説明書にしたがってスクリーニングし、ポジティブクローン(ベイトであるGANPとの結合が認められたクローン)を得た。

【0038】(2)前記ポジティブクローンのプラスミドのインサートの塩基配列をDNAシーケンサー373A(パーキンエルマー社製)を用い、Taqサイクルシーケンシング法により決定した。前記インサートの長さは1.5kbであった。

【0039】(3)前記インサートの配列から下記の塩基配列1からなるプライマー1を作製した。

塩基配列1: ACAGCTCTAGATTCTCTCTCG (配列表の配列番号5に記載の塩基配列)

(4)前記プライマーを使用して、λgt11-WEHI231 cDNAライブラリーを鋳型として、5'方向への一方のみのPCRを行った。PCR操作は、マラソン(登録商標) cDNAアンプリフィケーションキット(クロンテック社製)を使用して行った。

(5)得られたPCR産物をDNAシーケンサ373Aを用い、Taqサイクルシーケンシング法により決定した。

【0040】(6)前記1.5kbのインサートおよび前記PCR産物の塩基配列から下記の塩基配列2からなるプライマー2および下記の塩基配列3からなるプライマー3を作製した。

塩基配列2: CCGCTCGAGCGGGGTACCA CCATGGACTGGAAAGACGT (配列表の配列番号6に記載の塩基配列)

塩基配列3: CCGCTCGAGCGGGAATTCC CTGAAGTGAGATTTTCAAAGG (配列表の配列番号7に記載の塩基配列)

(7)B細胞のmRNAを抽出し、該抽出したmRNAを鋳型として用いてRT-PCR法によりcDNAを単離した。その塩基配列を配列表の配列番号2に示す。このcDNAが全長の蛋白質をコードするcDNAである。該cDNAがコードする蛋白質をCALPP(カルシウム結合ホスファターゼ結合蛋白質)と名付けた。該蛋白質のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0041】CALPPは、特徴的なカルシウム結合モチーフEFハンド(配列表の配列番号1に記載のアミノ配列の286番目ないし298番目のアミノ酸からなる

配列)を持ち、蛋白質脱リン酸化酵素プロテインホスファターゼ2Aの制御分子との類似した一次構造を有する新規のカルシウム結合蛋白質脱リン酸化酵素制御分子である。蛋白質脱リン酸化制御は細胞の分裂や突然変異や、遺伝子修復過程で重要な機能を担っている。

【0042】CALPPは、胚中心会合核蛋白質であるGANPと結合する分子である。GANPのアミノ酸配列を配列表の配列番号3に示す。GANPの分子量は210kDである。GANP cDNAの塩基配列を配列表の配列番号4に示す。GANPは以下の機能を有する。GANPは胚中心でmRNAおよび蛋白質の発現が上昇する。GANPは、細胞の分裂周期によって、細胞質から核、核から細胞質へと移動する。GANPの移動が細胞の分裂制御と関連すると考えられる。B細胞に、抗原刺激分子でありかつ胚中心での刺激分子であるCD40分子を介して刺激を与えるとGANPの発現が上昇し、そのリン酸化反応が上昇する。CD40の刺激によりB細胞が活性化され、免疫グロブリンの有効な産生が促進されるので、GANPは免疫グロブリンの有効な産生の促進に関連する。異常抗体産生マウスの末梢リンパB細胞では、GANPの発現の上昇が見られる。

【0043】CALPPはGANPと結合するカルシウム結合蛋白質脱リン酸化酵素制御分子であるので、その機能は以下のものであると考えられる。CALPPは、胚中心のB細胞に発現し、核と細胞質との間を移動する。カルシウム依存性のシグナルと関連し、細胞質内、核内蛋白質の脱リン酸化制御を行う。細胞の分裂制御に関連する。CALPPは、CD40の刺激を伝達するシグナル分子である。これより、CALPPは、免疫グロブリンの有効な産生の制御を担っているものと考えられる。異常抗体産生B細胞では、GANPと結合し、その増殖を抑制する。

【0044】前記のCALPPの機能より、CALPPはB細胞の機能制御の標的分子となることが十分考えられる。具体的には以下の利用が考えられる。抗体産生細胞の成熟の誘導や有効な免疫応答惹起に向けた新たな免疫増強剤。自己免疫疾患における異常なB細胞増殖や、自己抗体産生B細胞クローンの増加を制御する自己免疫疾患の治療薬。また、CALPP遺伝子は、前記の目的の遺伝子治療の用途に利用可能であると考えられる。

【0045】＜実施例2＞試験管内結合検定によるGANPとCALPPの検出  
Oncogene 11巻1587ページに記載の方法にしたがい、GANP cDNAとCALPP cDNAのそれぞれから試験管内転写および翻訳 (in vitro

transcription/translation)により得たマウスGANPとマウスCALPPを用いて、試験管内結合検定 (in vitro binding assay)を行った。この方法の概略を以下に示す。

【0046】1) TNT発現システム (TNT expression system) (プロメガ社製) とT7ポリメラーゼを使用して、プラスミドDNAの転写と翻訳により、<sup>35</sup>S-メチオニンで標識された蛋白質 (CALPPおよびGANP) を合成した。

2) CALPPとGANPとをそれぞれ5μlずつ混合し、30℃で30分間インキュベートした。

3) そして、混合物を、1mlの氷冷したNP40緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5mM NaCl、1% NP40、3% BSA、50mM NaF、0.1mM バナジウム酸ナトリウム、1mM フッ化フェニルメチルスルホン酸 (PM SF)、20μg/ml アプロチニン) で希釈し、14000rpm、4℃で10分間遠心分離した。上清950μlに5μlの抗GANP抗体を加えて1時間反応させて免疫沈降し、免疫沈降物をプロテインセファロースAビーズ (ファルマシアバイオテック社製) で回収した。

【0047】抗GANP抗体は、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列の679ないし1028番のアミノ酸をコードするGANP cDNA断片、すなわち配列表の配列番号4に記載の塩基配列の2418番目ないし3467番目の塩基からなるcDNA断片をpGEX-4T-1ベクター (ファルマシアバイオテック社製) に導入して作製したGST-GANP融合蛋白質をラットに免疫して作製した。

【0048】4) 前記ビーズを1mlのNP40緩衝液で洗浄することを3回繰り返し、10mM Tris-HCl (pH7.5) で1回洗浄し、20μlの2×サンプル緩衝液 (1×サンプル緩衝液は、62.5mM Tris-HCl (pH6.8)、5% 2-メルカプトエタノール、2% SDS、10%グリセロール、0.003% ブロモフェノールブルーである。) に懸濁し、5分間煮沸した。得られた蛋白質を12% SDS-PAGE電気泳動 (常法) により分画した。電気泳動の結果抗GANP抗体での免疫沈降物中にGANP以外に、GANPに結合していたCALPPが検出され、GANPとCALPPが結合することが確認された。

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Electric Industries, Ltd.

<120> CALPP Protein

<130> 099Y0296

<160> 7

11

12

<210> 1  
 <211> 405  
 <212> PRT  
 <213> Mus  
 <400> 1  
 Met Asp Trp Lys Asp Val Leu Arg Arg Arg Leu Ala Ser Pro Asn Thr  
 1 5 10 15  
 Asp Pro Lys Arg Lys Lys Ser Glu Gln Glu Leu Lys Asp Glu Glu Met  
 20 25 30  
 Asp Leu Phe Thr Lys Tyr Tyr Ser Glu Trp Lys Gly Gly Arg Lys Asn  
 35 40 45  
 Thr Asn Glu Phe Tyr Lys Thr Ile Pro Arg Phe Tyr Tyr Arg Leu Pro  
 50 55 60  
 Ala Glu Asp Glu Val Leu Leu Gln Lys Leu Arg Glu Glu Ser Arg Ala  
 65 70 75 80  
 Val Phe Leu Gln Arg Lys Ser Arg Glu Leu Leu Asp Asn Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Gln Asn Leu Trp Phe Leu Leu Asp Lys His Gln Ile Pro Pro Met Ile  
 100 105 110  
 Gly Glu Glu Ala Met Ile Asn Tyr Glu Asn Leu Leu Lys Val Gly Glu  
 115 120 125  
 Lys Ala Gly Pro Thr Ala Ser Gln Phe Phe Thr Ala Lys Val Phe Ala  
 130 135 140  
 Lys Leu Leu His Thr Asp Ser Tyr Gly Arg Ile Ser Ile Met Gln Phe  
 145 150 155 160  
 Phe Asn Tyr Val Met Arg Lys Val Trp Leu His Gln Thr Arg Ile Gly  
 165 170 175  
 Leu Ser Leu Tyr Asp Val Ala Gly Gln Gly Tyr Leu Arg Glu Ser Asp  
 180 185 190  
 Leu Glu Asn Tyr Ile Leu Glu Leu Ile Pro Thr Leu Pro Gln Leu Asp  
 195 200 205  
 Gly Leu Glu Lys Ser Phe Tyr Ser Phe Tyr Val Cys Thr Ala Val Arg  
 210 215 220  
 Lys Phe Phe Phe Phe Leu Asp Pro Leu Arg Thr Gly Lys Ile Lys Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Ile Leu Ala Cys Ser Phe Leu Asp Asp Leu Leu Glu Leu Arg  
 245 250 255  
 Asp Glu Glu Leu Ser Lys Glu Ser Gln Glu Thr Asn Trp Phe Ser Ala  
 260 265 270  
 Pro Ser Ala Leu Arg Val Tyr Gly Gln Tyr Leu Asn Leu Asp Lys Asp  
 275 280 285  
 His Asn Gly Met Leu Ser Lys Glu Glu Leu Ser Arg Tyr Gly Thr Ala  
 290 295 300  
 Thr Met Thr Asn Val Phe Leu Asp Arg Val Phe Gln Glu Cys Leu Thr  
 305 310 315 320  
 Tyr Asp Gly Glu Met Asp Tyr Lys Thr Tyr Leu Asp Phe Val Leu Ala  
 325 330 335  
 Leu Glu Asn Arg Lys Glu Pro Ala Ala Leu Gln Tyr Ile Phe Lys Leu  
 340 345 350  
 Leu Asp Ile Glu Asn Lys Gly Tyr Leu Asn Val Phe Ser Leu Asn Tyr



13

14

355                      360                      365  
 Phe Phe Arg Ala Ile Gln Glu Leu Met Lys Ile His Gly Gln Asp Arg  
 370                      375                      380  
 Ile Leu Cys His Phe Lys Met Ser Arg Met Lys Ser Leu Thr Trp Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Asn Gln Arg Ile Leu  
 405

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1611

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;400&gt; 2

```

ccacgcgtcc gctcttaaca aactgcaaat gtagggctct ctgagcggga gtcaacc      57
atg gac tgg aaa gac gtg ctt cgc cgg cgg tta gcg tcg ccc aac acg      105
gat cca aag agg aaa aaa agc gaa caa gaa tta aaa gat caa gaa atg      153
gat tta ttt acc aaa tac tac tca gag tgg aaa gga ggt aga aaa aac      201
aca aac gag ttc tat aag acc ata ccc cgg ttt tat tac agg ttg cca      249
gct gaa gat gaa gtc tta cta cag aaa tta cga gag gaa tct aga gct      297
gtc ttt cta cag agg aaa agc aga gaa ctc tta gat aac gaa gag ttg      345
cag aac tta tgg ttt ttg ctg gat aaa cac cag ata cca cct atg att      393
gga gag gaa gca atg atc aat tat gaa aat tta ttg aag gtt ggt gaa      441
aaa gct gga cca act gca agc caa ttt ttt act gca aaa gtc ttt gcc      489
aaa ctc ctt cat aca gat tca tat gga cga att tcc atc atg cag ttc      537
ttt aac tac gtc atg cga aaa gtt tgg ctg cat cag aca aga ata gga      585
ctc agt tta tat gat gtt gct ggc caa gga tac ctt cgg gaa tca gac      633
ctg gag aac tac atc ctg gag ctg atc ccg acg ctg cca cag ctg gac      681
ggg ctg gag aag tcc ttc tac tcc ttc tat gtc tgc act gca gtc agg      729
aag ttc ttc ttc ttc ttg gac cct cta aga aca ggg aag atc aaa att      777
caa gat att ttg gca tgc agt ttt cta gat gat tta ctg gag cta aga      825
gat gag gaa ttg tcc aaa gaa agt caa gaa aca aat tgg ttt tct gct      873
cct tct gcc ctg agg gtc tat ggt cag tat ttg aat ctt gat aaa gat      921
cat aat ggc atg cta agt aaa gag gag ctc tcc cgt tac gga aca gca      969
acc atg acc aat gtc ttc tta gac cga gtt ttc cag gag tgt ctc act      1017
tac gat gga gaa atg gac tat aag acc tac ctg gac ttt gtt ctt gcc      1065
tta gaa aac aga aag gag cct gca gct ctg cag tac att ttc aaa ctg      1113
ctg gac att gag aac aag gga tac ctg aat gtc ttt tcc ctt aat tat      1161
ttc ttt agg gcc ata caa gaa cta atg aaa atc cat gga cag gac agg      1209
atc ctg tgt cat ttc aag atg tca agg atg aaa tct ttg aca tgg tca      1257
aac caa agg atc ctt tga aaatctcact tcaggattta atcaacagta      1305
atcaaggaga cacagtcact accattctaa ttgatctcaa tggcttctgg acctacgaga      1365
acagagaagc ccttgttgca aatgacaacg agaactctgc agatcttgat gacacatgat      1425
ctctgcaaaa tagacttctt cataaagatg cttgaatgct gcatgcaaca ctgttgaaac      1485
agaatcctta gaaacgttct aaataaaact catcacatgc ctgtacaaca taaaaaaaaa      1545
aaaaaaaaaa aaaagtcgac gcggccgcga tttccnggnc ctatgaattn taagnccacc      1605
aaatac

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1971

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus

&lt;400&gt; 3

15

16

Met	His	Pro	Val	Asn	Pro	Phe	Gly	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Ala	Phe	Ala
1				5					10					15	
Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Tyr	Gln	Thr	Lys	Ser	Pro	Phe	Arg
			20					25					30		
Phe	Gly	Gln	Pro	Ser	Leu	Phe	Gly	Gln	Asn	Ser	Thr	Pro	Ser	Lys	Ser
		35					40					45			
Leu	Ala	Phe	Ser	Gln	Val	Pro	Ser	Phe	Ala	Thr	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser
	50					55				60					
His	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Phe	Gly	Leu	Thr	Gln	Thr	Ser	Ser	Val
65				70					75					80	
Gly	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	Pro	Ser	Phe	Ala	Ala	Thr	Ser
				85				90						95	
Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asn	Thr	Ala	Phe	Ser	Phe	Lys	Ser	Thr	Ser
			100					105					110		
Ser	Val	Gly	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	Ala	Thr	Phe	Gly	Pro	Glu	Thr	Gly
	115						120					125			
Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Phe	Arg	Lys	Thr	Glu	Phe	Lys	Phe	Lys	Pro
	130					135				140					
Leu	Glu	Asn	Ala	Val	Phe	Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Pro	Glu	Ser	Glu	Pro
145				150					155					160	
Glu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser	Gly	Phe	Phe	Thr	Phe	Ser	His
				165				170						175	
Pro	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Thr	Pro	Phe	Ser	Phe	Pro	Gln
		180					185						190		
Val	Thr	Asn	Ser	Ser	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Phe	Ile	Phe	Ser	Lys	Pro
	195						200					205			
Val	Thr	Ser	Asn	Thr	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Pro	Leu	Ser	Asn	Gln	Asn
	210					215						220			
Val	Glu	Glu	Glu	Lys	Arg	Val	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn
225				230					235					240	
Ser	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Pro	Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Glu
				245				250					255		
Pro	Phe	Pro	Ala	Asn	Lys	Pro	Ser	Leu	Arg	Gln	Gly	Cys	Glu	Glu	Ala
			260					265					270		
Ile	Ser	Gln	Val	Glu	Pro	Leu	Pro	Thr	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Lys	Arg
	275					280						285			
Lys	Glu	Asp	Gln	Asp	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	His	Cys	His	Glu	Ala	Ala
	290				295						300				
Glu	Asp	Pro	Asp	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Asp	Lys	Arg
305				310					315					320	
Pro	Val	Arg	Leu	Asn	Arg	Pro	Arg	Gly	Gly	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Thr
			325					330					335		
Ile	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Ser	Asn	Lys	Glu	Ala	Gly	Arg	Leu	Gly	Ser
		340						345					350		
Lys	Glu	Ser	Lys	Glu	Ser	Gly	Phe	Ala	Glu	Pro	Gly	Glu	Ser	Asp	His
	355					360						365			
Ala	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Thr	Met	Val	Pro	Ser	Arg	Leu
	370					375						380			
Pro	Ala	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Ser	Arg	Asp	Glu	Lys	Glu	Asp
385				390					395					400	

Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Arg Glu Glu Trp  
 405 410 415  
 Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ala Ile Gln  
 420 425 430  
 Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Ala Ile Leu Glu Lys  
 435 440 445  
 His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Val Phe Thr Arg Arg Ser  
 450 455 460  
 Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys Asp Val Val Ile Phe Trp  
 485 490 495  
 His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys Leu Phe Pro Leu Lys Glu  
 500 505 510  
 Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly Ile Glu Asp Ser Pro Phe  
 515 520 525  
 Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val Arg Pro Ala Ala Gly Ser  
 530 535 540  
 Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys Met  
 545 550 555 560  
 His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu  
 565 570 575  
 Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val  
 580 585 590  
 Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg  
 595 600 605  
 Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg  
 610 615 620  
 Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr  
 625 630 635 640  
 Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro Gly  
 645 650 655  
 Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser  
 660 665 670  
 Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Ser Ala  
 675 680 685  
 Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp Gln  
 690 695 700  
 Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr  
 705 710 715 720  
 Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro Leu  
 725 730 735  
 Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys Ala  
 740 745 750  
 His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn  
 755 760 765  
 Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln  
 770 775 780  
 Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln  
 785 790 795 800

Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu			
805	810	815	
Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn Ser Pro Glu Val Asn Phe			
820	825	830	
Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe			
835	840	845	
Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu His			
850	855	860	
Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn Val			
865	870	875	880
Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Val Phe Pro Leu Asp Gly			
885	890	895	
Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asn Phe			
900	905	910	
Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn			
915	920	925	
Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Cys Lys Ala Arg Lys Ser			
930	935	940	
Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Val Val Asn			
945	950	955	960
Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser Phe			
965	970	975	
Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser Leu Ala Thr Glu Leu Pro			
980	985	990	
Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro Ala Gly Gly Gly Arg Gly			
995	1000	1005	
Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu Pro Thr Leu Ala Val Leu Pro			
1010	1015	1020	
Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala Thr Pro Ala Leu His Val Gln Pro			
1025	1030	1035	1040
Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Gln Ala Ser Thr Gln Pro			
1045	1050	1055	
Glu Val Leu Leu Pro Lys Pro Ala Pro Val Tyr Ser Asp Ser Asp Leu			
1060	1065	1070	
Val Gln Val Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Val Asp Cys			
1075	1080	1085	
Glu Glu Val Ser Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Val Ala Ala Ala Leu Gly			
1090	1095	1100	
Val Ser Asn Ala Ala Val Glu Asp Leu Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly			
1105	1110	1115	1120
Ile Leu Arg His Val Ala Ala Glu Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg			
1125	1130	1135	
Leu Glu Glu Glu Lys Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu			
1140	1145	1150	
Arg Glu Leu Met Leu Thr Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu Leu			
1155	1160	1165	
Thr Glu Leu Thr Val Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser Gln Glu			
1170	1175	1180	
Leu Gln Ser Ala Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val Ala Arg Cys			
1185	1190	1195	1200

Cys Glu Ala Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe Leu Ala Glu Glu  
 1205 1210 1215  
 Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys  
 1220 1225 1230  
 Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Phe  
 1235 1240 1245  
 Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val  
 1250 1255 1260  
 Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Thr  
 1265 1270 1275 1280  
 Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Lys  
 1285 1290 1295  
 Val Gly Val Ser Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala  
 1300 1305 1310  
 His Gln Ile Lys Val Gln His Phe His Gln Gln Leu Leu Arg Asn Ala  
 1315 1320 1325  
 Ala Trp Ala Pro Leu Asp Leu Pro Ser Ile Val Ser Glu His Leu Pro  
 1330 1335 1340  
 Met Lys Gln Lys Arg Arg Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp  
 1345 1350 1355 1360  
 Val Glu Glu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp  
 1365 1370 1375  
 Leu Lys Val Lys Phe Thr Gly Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly  
 1380 1385 1390  
 Asp Asn Ala Gly Asp Ile Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu Ser  
 1395 1400 1405  
 Ser Lys Gly Asp Gln Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala  
 1410 1415 1420  
 His Gly Thr Leu Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys  
 1425 1430 1435 1440  
 Asp Leu Leu Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Val  
 1445 1450 1455  
 Lys Ser Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser Trp Leu Ser Ala Leu  
 1460 1465 1470  
 Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu  
 1475 1480 1485  
 Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Ser Ala Gly Arg  
 1490 1495 1500  
 Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu  
 1505 1510 1515 1520  
 Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val Glu Ile Pro Asp Ser Val Asn Asp Leu  
 1525 1530 1535  
 Gln Gly Thr Val Lys Val Ser Gly Ala Val Gln Trp Leu Ile Ser Gly  
 1540 1545 1550  
 Cys Pro Gln Ala Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Val Gln Tyr Val  
 1555 1560 1565  
 Glu Asp Gly Ile Ser Arg Glu Phe Ser Arg Arg Phe Phe His Asp Arg  
 1570 1575 1580  
 Arg Glu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Pro Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile  
 1585 1590 1595 1600

Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser  
 1605 1610 1615  
 Ser Glu Gln Leu Cys Asp Ile Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu  
 1620 1625 1630  
 Val Gly Gly Ser Gln Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro Glu  
 1635 1640 1645  
 His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln  
 1650 1655 1660  
 Met Asp Leu Pro Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met  
 1665 1670 1675 1680  
 Val Ile Gln Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Gln Thr Gln Pro  
 1685 1690 1695  
 Val Leu Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys Arg Thr Tyr Gln Lys  
 1700 1705 1710  
 Trp Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln Glu Leu Gly Pro Ser Val  
 1715 1720 1725  
 Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile Thr Leu Cys Ile Asn His Lys  
 1730 1735 1740  
 Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val Thr Leu Glu Ala Leu  
 1745 1750 1755 1760  
 Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn Leu Leu Arg  
 1765 1770 1775  
 Lys Tyr His Val Pro Ser Ser Trp Glu Gln Ala Arg Met Gln Thr Gln  
 1780 1785 1790  
 Arg Glu Leu Gln Leu Ser His Gly Arg Ser Gly Met Arg Ser Ile His  
 1795 1800 1805  
 Pro Pro Thr Ser Thr Phe Pro Thr Pro Leu Leu His Val His Gln Lys  
 1810 1815 1820  
 Gly Lys Lys Lys Glu Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu  
 1825 1830 1835 1840  
 Asp Leu Leu Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu  
 1845 1850 1855  
 Ser Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp  
 1860 1865 1870  
 Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu Ser  
 1875 1880 1885  
 Thr Arg Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe Pro Asp  
 1890 1895 1900  
 Ser Ile Lys Thr Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser Pro Gln Asn  
 1905 1910 1915 1920  
 Ser Gly Thr Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala Ser Gly Ser Ser  
 1925 1930 1935  
 Leu Thr Glu Lys Leu Lys Leu Leu Glu Arg Leu Ile Gln Ser Ser Arg  
 1940 1945 1950  
 Ala Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Glu Met  
 1955 1960 1965  
 Val Asp Met  
 1970  
 <210> 4  
 <211> 6429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus

&lt;400&gt; 4

gttgcggtgc ggtgggcccg gtagaggctg cacgcagact gtggcgagc acaagcgctg	60
gcgacagtgg ccgtatctgg cggacttgct cctccctccg cggcctccgc tgtcccttgt	120
gtctttgccg agttgctgaa ggcccttact agtcttcgct cgaaggcgtc tgtaacctta	180
gcggccggct tccggagtgt taagcatcgg ggataaaaag ctattatttc tagaccaggg	240
catcgcaagt tcgagttacc gggagaaaaa tgagatggtc atcctgagga tgaaggagag	300
cttccctgg caacagataa tttaaaggagg agagctactt gtgtatagtc catatttatt	360
gccttcagat aattggcttg aag atg cac ccg gtg aac ccc ttc gga ggc agc	413
agc cca agt gct ttt gcg gta tct tcc agc acc acg gga aca tat cag	461
act aaa tca cca ttt cga ttt ggc cag cct tcc ctt ttt gga cag aac	509
agc aca ccc agc aag agc ctg gcg ttt tca caa gta cca agc ttt gca	557
aca ccc tct gga gga agc cat tct tcc tcc ttg cca gca ttt gga ctc	605
acc caa acc tca agt gtg gga ctc ttc tct agt ctc gaa tcc aca cct	653
tct ttc gca gct act tcg agt tcc tct gtg ccc ggc aat acg gca ttc	701
agc ttt aag tca acc tct agc gtt ggg gtt ttc cca agt ggc gct act	749
ttt ggg cca gaa acc gga gaa gta gca ggt tct ggc ttt cgg aag acg	797
gaa ttc aag ttt aaa cct ctg gaa aat gca gtc ttc aaa ccg ata ccg	845
ggg cct gag tca gag cca gaa aaa acc cag agc cag att tct tct gga	893
ttt ttt aca ttt tcc cat ccc gtt ggt agc ggg tct gga ggc ctg acc	941
cct ttt tct ttc cca cag gtg aca aat agt tcg gtg act agc tca agt	989
ttt atc ttt tcg aaa cca gtt act agt aat act cct gcc ttt gcc tct	1037
cct ttg tct aac caa aat gta gaa gaa gag aag agg gtt tct acg tca	1085
gcg ttt gga agc tca aac agt agc ttc agt act ttc ccc aca gcg tca	1133
cca gga tct ttg ggg gag ccc ttc cca gct aac aaa cca agc ctc cgc	1181
caa gga tgt gag gaa gcc atc tcc cag gtg gag cca ctt ccc acc ctc	1229
atg aag gga tta aag agg aaa gag gac cag gat cgc tcc ccg agg aga	1277
cat tgc cac gag gca gca gaa gac cct gat ccc ctg tcc agg ggc gac	1325
cat ccc cca gat aaa cgg cca gtc cgc ctc aac aga ccc cgg gga ggt	1373
act ttg ttt ggc cgg aca ata cag gag gtc ttc aaa agc aat aaa gag	1421
gca ggc cgc ctg ggc agc aag gaa tcc aag gag agt ggc ttt gcg gaa	1469
cct ggg gaa agt gac cac gcg gcc gtc cca gga ggg agt cag tcc acc	1517
atg gta cct tcc cgc ctt cca gct gtg act aaa gag gaa gaa gaa agt	1565
aga gat gag aaa gaa gat tct ctc agg gga aag tct gtg cgc cag agt	1613
aag cga agg gaa gag tgg atc tac agc ctc ggg ggc gtg tct tct tta	1661
gag ctc aca gcc atc cag tgc aag aac atc ccc gac tac ctc aac gac	1709
aga gcc atc ctg gag aaa cac ttc agc aaa atc gct aaa gtc cag cgg	1757
gtc ttc acc aga cgc agc aag aag ctc gcc gtg att cat ttt ttc gac	1805
cac gca tcg gca gcc ctg gct agg aag aag ggg aaa ggt ctg cat aag	1853
gac gtg gtt atc ttt tgg cac aag aag aaa ata agt ccc agc aag aaa	1901
ctc ttt ccc ctg aag gag aag ctt ggt gag agt gaa gcc agc cag ggc	1949
atc gag gac tcc ccc ttt cag cac tcg cct ctc agc aag ccc atc gtg	1997
agg cct gca gcc ggc agc ctc ctc agc aaa agc tct cca gtg aag aag	2045
ccg agt ctt ctg aag atg cac cag ttt gag gcg gat cct ttt gac tct	2093
gga tct gag ggc tcc gag ggc ctt ggt tct tgc gtg tca tct ctt agc	2141
acc ctg ata ggg act gtg gca gac aca tct gag gag aag tac cgc ctt	2189
ctg gac cag aga gac cgc atc atg cgg caa gct cga gtg aag agg acg	2237
gac ctg gac aaa gcc agg gca ttt gtt ggg act tgc cct gac atg tgt	2285
ccc gag aag gag cgg tac ttg agg gag acc cgg agc cag ctg agc gtg	2333

ttt gaa gtt gtc cca ggg act gac cag gtg gac cat gca gca gcc gtg	2381
aag gag tac agc cgg tcc tct gca gat cag gag gag ccc ctg cca cat	2429
gag ctg aga ccc tca gca gtt ctg agc agg acc atg gac tac ctg gtg	2477
acc cag atc atg gac caa aag gaa ggc agc ctt cgg gat tgg tat gac	2525
ttc gtg tgg aac cgc acc cgg ggt ata cgg aag gac ata aca cag cag	2573
cac ctg tgt gat ccc ctg acg gtg tct ctg atc gag aag tgt acc cga	2621
ttt cac att cac tgt gcc cac ttt atg tgt gag gag cct atg tct tcc	2669
ttt gat gcc aag atc aac aat gag aac atg acc aag tgt cta cag agt	2717
ctg aag gag atg tac cag gac ctg agg aac aag ggt gtt ttt tgt gcc	2765
agt gaa gca gag ttt cag ggc tac aat gtc ctg ctt aat ctg aac aaa	2813
gga gac att ttg aga gaa gtg cag cag ttc cac cct gac gtt agg aac	2861
tcc cca gag gtg aac ttc gct gtc cag gct ttt gct gca ttg aac agc	2909
aat aat ttt gtg aga ttt ttc aaa ctg gtt cag tca gct tct tac ctg	2957
aat gcg tgc ctg tta cac tgt tac ttt aat cag atc cgc aag gat gcc	3005
ctc cgg gca ctg aat gtt gct tat act gta agc aca cag cgc tct acc	3053
gtc ttc ccc ctg gat ggt gtc gtc cgc atg ctg ctg ttc aga gat agt	3101
gaa gag gcg aca aac ttc ctg aat tac cat ggc ctg act gta gct gat	3149
ggc tgt gtt gag ctg aat cgg tcg gca ttc ttg gaa ccg gag gga tta	3197
tgc aag gcc agg aag tca gtg ttt att ggc cgg aag ctg acg gtg tca	3245
gtt ggg gaa gtt gtg aat gga ggg ccg ttg ccc cct gtt cct cgc cat	3293
aca cct gtg tgc agc ttc aac tcc cag aat aag tac gtt gga gag agc	3341
ctg gct acg gag ctg ccc atc agc act cag aga gct ggt gga gac cca	3389
gca ggt ggt ggc aga gga gag gac tgt gag gca gag gtg gac ttg cca	3437
aca ttg gcg gtc ctg cca cag ccg cct cct gca tcc tca gcc acg ccg	3485
gcg ctt cat gtc cag cca ctg gcc cca gcc gca gca ccc agc ctt ctg	3533
cag gcc tcc acg cag cct gag gtg ctg ctt cca aag cct gcg cct gtg	3581
tac tct gac tcg gac ctg gta cag gtg gtg gac gag ctg atc cag gag	3629
gct ctg caa gtg gac tgt gag gaa gtc agc tcc gct ggg gca gcc tac	3677
gta gcc gca gct ctg ggc gtt tcc aat gct gct gtg gag gat ctg att	3725
act gct gcg acc acg ggc att ctg agg cac gtt gcc gct gag gaa gtt	3773
tcc atg gaa agg cag aga cta gag gaa gag aag caa cga gct gag gag	3821
gaa cgg ttg aag caa gag aga gaa ctg atg tta act cag ctg agc gag	3869
ggt ctg gcc gca gag ctg aca gaa ctg acg gtg aca gag tgt gtg tgg	3917
gaa acc tgc tct cag gag cta cag agt gca gta aaa ata gac cag aag	3965
gtc cgt gtg gcc cgc tgt tgt gaa gcc gtc tgt gca cac ctg gtg gat	4013
ttg ttt ctt gct gag gaa att ttc cag act gca aaa gag aca ctg cag	4061
gaa ctg cag tgt ttc tgc aag tat cta caa cgg tgg agg gag gct gtt	4109
gca gct cgg aag aaa ttc cgg cgt cag atg cgg gcc ttc cct gca gcg	4157
cca tgc tgt gtg gat gtg aat gac cgg ctg cag gca cta gtg ccc agc	4205
gca gag tgc ccc att act gag gag aac ctg gcc aag ggt ctt ttg gac	4253
ctg ggc cac gca ggc aaa gta ggc gtc tcc tgt acc agg ttg agg cgg	4301
ctt aga aac aag aca gct cac cag ata aag gtc cag cac ttc cac cag	4349
cag ctg ctg agg aat gct gca tgg gca cct ctg gac ctg cca tcc att	4397
gtg tct gag cac ctg ccc atg aag cag aag cga agg ttt tgg aaa ctg	4445
gtg ctg gtg ttg cct gat gtg gaa gag cag act cca gag agt cct ggc	4493
aga ata cta gaa aac tgg cta aag gtc aaa ttc aca gga gat gac agc	4541
atg gtg ggt gac ata gga gat aat gct ggt gat atc cag acc ctg tca	4589
gtc ttt aat aca ctt agt agt aaa ggg gat caa aca gtt tct gtc aac	4637
gtg tgt ata aag gtg gct cat ggc acc ctt agt gac agt gcc ctt gat	4685
gct gtg gag acc cag aag gac ctg ttg gga acc agt ggg ctg atg ctg	4733



ctg ctt ccc ccg aaa gtg aag agt gag gag gtg gca gag gag gaa ctg 4781  
 tcc tgg ctg tcg gct tta ctg cag ctc aag cag ctt ctg cag gcc aag 4829  
 ccc ttc cag cct gcc ctg ccg ctg gtg gtc ctc gtg ccc agc tcc aga 4877  
 ggg gac tcc gcg ggg agg gca gta gag gac ggt ctg atg tta cag gat 4925  
 ttg gtt tca gcc aag ctg att tcc gat tac att gtt gtt gag att cct 4973  
 gac tct gtt aat gat tta caa ggc aca gtg aag gtt tct gga gca gtc 5021  
 cag tgg ctg atc tcc gga tgt cct caa gcc cta gac ctt tgc tgc cag 5069  
 acc ctt gtt cag tat gtt gag gat ggg atc agc cgc gag ttc agc cgt 5117  
 cgg ttt ttc cac gac agg aga gag agg cgc ctg gct agc ctg ccc tcc 5165  
 cag gag cct agc acc att att gag ttg ttc aac agt gtg ctg cag ttc 5213  
 ctg gcc tct gtg gta tcc tct gag cag ctg tgl gac atc tcc tgg cct 5261  
 glc atg gaa ttt gcc gaa gtg gga ggc agc cag ctg ctt cct cac ctg 5309  
 cac tgg aac tca cca gag cat cta gcg tgg ctg aaa caa gct gtg ctt 5357  
 ggg ttc cag ctt cca cag atg gac ctt cca ccc cca ggg gcc ccc tgg 5405  
 ctc cct gtg tgt tcc atg gtc att cag tac acc tcc cag att ccc agc 5453  
 tca agc cag aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gcg gag aac ctg ctg 5501  
 tgc aga aca tac cag aag tgg aag aac aag agc ctc tct cca ggc cag 5549  
 gag ttg ggg cct tct gtt gcc gag atc ccg tgg gat gac atc atc acc 5597  
 tta tgc atc aat cat aag ctg agg gac tgg aca ccc ccc agg ctc cct 5645  
 gtc aca tta gag gcg ctg agt gaa gat ggt caa ata tgt gtg tat ttt 5693  
 ttc aaa aac ctt tta aga aaa tac cac gtt ccc tcg tca tgg gaa cag 5741  
 gcc aga atg cag acg cag cgg gaa ctg cag ctg agt cat gga cgt tcg 5789  
 ggg atg agg tcc atc cat cct cct aca agc act ttt cct act cca ttg 5837  
 ctt cat gta cac cag aaa ggg aag aaa aag gaa gag agt ggc cga gag 5885  
 ggg agc ctc agt aca gag gac ctc ctg cgg ggg gct tct gca gaa gag 5933  
 ctc ctg gca cag agt ctg tcc agc agt ctt ctg gaa gag aag gaa gag 5981  
 aac aag agg ttt gaa gat caa ctt cag cag tgg tta tcg caa gac tca 6029  
 cag gca ttc aca gag tca act cgg ctt cct ctc tac ctc cct cag acg 6077  
 cta gtg tcc ttt cct gat tct atc aaa act cag acc atg gtg aaa aca 6125  
 tct aca agt cct cag aat tca gga aca gga aag cag ttg agg ttc tca 6173  
 gag gca tcc ggt tca tcc ctg acg gaa aag ctg aag ctc ctg gaa agg 6221  
 ctg atc cag agc tca agg gcg gaa gaa gca gcc tcc gag ctg cac ctc 6269  
 tct gca ctg ctg gag atg gtg gac atg tag ctgtctgacg ggagacggat 6319  
 ctctaattca taatgctttg tctgtattca attgtgttat agatgctgtt ggaaatgtga 6379  
 ctattaatta tgcaataaaa ctttttgaat cattccaaaa aaaaaacat 6429  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Synthetic DNA  
 <400> 5  
 acagctctag attcctctcg 20  
 <210> 6  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Synthetic DNA  
 <400> 6  
 ccgctcgagc ggggtaccac catggactgg aaagacgt 38  
 <210> 7  
 <211> 40  
 <212> DNA

(17)

特開 2 0 0 1 - 7 8 7 7 9

31

32

<213> Synthetic DNA

<400> 7

ccgctcgagc gggaattccc tgaagtgaga tttcaaagg

40

10

20

30

40

50